

TGF- β 及EGF信号对溶血磷脂酸诱导口腔鳞癌细胞增殖的影响

周小琼¹, 邓小玲^{2,*},
傅玉才¹, 许铭炎^{3,*}

(1. 汕头大学医学院细胞衰老实验室, 广东 汕头 515041; 2. 厦门大学医学院基础医学部, 福建 厦门 361102; 3. 厦门市口腔医院, 福建 厦门 361000)

The effects of TGF- β and EGF signal on lysophosphatidic acid-induced human oral squamous cell carcinoma cell proliferation

ZHOU Xiao-qiong¹, DENG Xiao-ling^{2,*},
FU Yu-cai¹, XU Ming-yan^{3,*}

(1. Laboratory of Cellular Senescence, Shantou University Medical College, Shantou 515041, Guangdong; 2. Department of Basic Medical Science, Xiamen University Medical College, Xiamen 361102, Fujian; 3. Xiamen Stomatology Hospital, Xiamen 361000, Fujian, China)

【摘要】目的: 探讨转化生长因子(TGF)及表皮生长因子(EGF)信号对溶血磷脂酸(LPA)诱导口腔鳞癌细胞增殖的影响。**方法:** 口腔鳞癌SAS细胞接种于96孔板中, 以含不同浓度(0、1、5和10 $\mu\text{mol/L}$)LPA的无血清DMEM分别处理细胞24和48 h后采用CCK-8法检测细胞增殖; 免疫印迹检测10 $\mu\text{mol/L}$ LPA分别处理细胞0、0.5、2和4 h后对TGF- β 下游信号分子Smad2的影响; 应用不同浓度(10、20和50 $\mu\text{g/mL}$)的TGF- β 阻断抗体1D11和100 nmol/L EGFR 阻断剂AG1478分别预孵育细胞2和4 h后, 再加入LPA诱导, 检测SAS细胞增殖情况。**结果:** LPA呈剂量效应和时间效应诱导SAS细胞增殖, LPA浓度增加到10 $\mu\text{mol/L}$ 时SAS细胞数是对照组的近1.7倍($P<0.01$), 细胞在LPA处理24 h后增殖速率较对照组增加22% ($P<0.05$)。LPA可活化TGF- β , 但TGF- β 阻断抗体1D11并不能阻断LPA诱导的SAS增殖; 相反, EGFR阻断剂AG1478能够抑制LPA诱导的SAS增殖, 抑制率达到近77%。**结论:** LPA诱导的口腔鳞癌SAS细胞的增殖与EGFR活化信号有关, 而与LPA诱导的TGF- β 活化无关。

【关键词】 口腔鳞癌; 增殖; 溶血磷脂酸; 转化生长因子; 表皮生长因子受体

中图分类号: R739.85 文献标志码: A 文章编号: 1004-616X(2014)01-0006-05 doi:10.3969/j.issn.1004-616x.2014.01.002

【ABSTRACT】OBJECTIVE: To investigate the effects of transforming growth factor- β (TGF- β) activation and epidermal growth factor receptor(EGFR) transactivation on lysophosphatidic acid (LPA)-induced human oral squamous cell carcinoma (OSCC) SAS cell proliferation. **METHODS:** SAS cells were seeded in 96-well plates and treated with LPA (0, 1, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h and 48 h, and CCK-8 method was used to detect cell proliferation; Western blotting was used to detect the effect of LPA(10 $\mu\text{mol/L}$) on TGF- β activation by examining the expression of p-Smad2. Pre-incubation of SAS cells with TGF- β blocking antibody 1D11 (10, 20 and 50 $\mu\text{g/mL}$) and EGFR inhibitor AG1478 (100 $\mu\text{mol/L}$) for 2 and 4 h were used to measure the effects of TGF- β activation and EGFR transactivation on LPA-induced SAS proliferation. **RESULTS:** LPA stimulated SAS cell proliferation in dose- and time-dependent manners. The cell number in LPA(10 $\mu\text{mol/L}$) treated group was 1.7 times higher than the number in untreated group ($P<0.01$). After 24 h incubation, the proliferation rate of LPA(10 $\mu\text{mol/L}$)treated group increased by 22% compared with the control group ($P<0.05$). LPA activated TGF- β . However, TGF- β blocking antibody 1D11 could not block LPA-induced SAS cell proliferation. In contrast, EGFR inhibitor AG1478 blocked LPA-induced SAS cell proliferation by 77%. **CONCLUSION:** LPA-induced SAS cell proliferation was dependent on EGFR transactivation and independent of TGF- β activation.

收稿日期: 2013-08-26; 修订日期: 2013-11-08

基金项目: 国家自然科学基金(81370160, 30900661, 81072208), 教育部留学回国人员科研启动基金, 汕头大学医学院基础与临床科研基金

作者简介: 周小琼 (1986—), 女, 湖南省人, 硕士研究生, 研究方向: 表观遗传及信号通路研究。E-mail: anding115078@163.com

*通信作者: 邓小玲, E-mail: xiaolingdeng@xmu.edu.cn; 许铭炎, E-mail: xymingyan@xmu.edu.cn

【KEY WORDS】 oral squamous cell carcinoma; proliferation; lysophosphatidic acid; transforming growth factor- β ; epidermal growth factor receptor

口腔鳞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是常见恶性肿瘤之一,其发生率约占所有恶性肿瘤的1.9%~3.5%。虽然医疗水平不断提高,但口腔鳞癌病人的5年生存率依然小于50%,严重危害着人类健康^[1-2]。

肿瘤发生是一个复杂的生理病理过程,细胞的过度异常增生是其主要特征之一。溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)是一种具有生物活性的磷脂,可诱导多种细胞功能如细胞增生等, LPA主要通过LPA受体介导其细胞效应,这些受体包括LPA 1~5,属于G蛋白偶联受体家族^[3]。研究表明,在头颈部鳞状细胞癌中, LPA可通过激活表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)活化Ras/MAPK信号通路,促进细胞的增殖^[4]。我们课题组前期研究发现, LPA可通过其受体LPA2及G蛋白 α q诱导转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)活化^[5]。TGF- β 是一种多功能的细胞因子,也参与调节细胞的增殖和分化^[6],研究表明,活化的TGF- β 可诱导成纤维细胞及卵巢癌细胞株SKOV3ip等细胞的增殖^[7-10],而LPA是否可通过活化TGF- β 1从而促进细胞增殖尚无报道。本研究以口腔鳞癌细胞SAS为实验对象,探讨LPA诱导的细胞增殖的信号通路,为揭示LPA在口腔鳞癌发生发展中的作用以及寻找相关分子靶标奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及细胞系

高糖DMEM培养基(Invitrogen公司),胎牛血清(Gibco公司),CCK-8(碧云天公司),AG1478、P-Smad2及Smad2抗体(CST公司),1D11(Abcam公司),口腔鳞癌细胞株SAS由哈尔滨医科大学郑金华教授惠赠。

1.2 细胞培养

SAS细胞株在5%CO₂、37℃条件下,用含有10%胎牛血清的高糖DMEM培养基贴壁培养,用0.25%的胰酶(含0.02% EDTA)进行消化传代,细胞汇合度为90%左右时用胰酶消化,待用。

1.3 细胞增殖实验

采用CCK-8法。将细胞浓度调整为 7×10^4 /mL,接种细胞于96孔板,每孔100 μ L,培养24 h后,更换无血清培养液继续培养24 h,每组实验均使用3孔细胞并重复3次。实验时,对照组加入无血清的DMEM,其他组每孔细胞分别加入含不同浓度(1、5和10 μ mol/L)

LPA的无血清DMEM,分别于培养24、48 h时弃去培养基,加入100 μ L含有10% CCK-8的无血清DMEM,继续培养2 h,酶标仪测定450 nm处吸光度值,并绘制标准曲线计算细胞数目。

1.4 信号通路研究实验

1.4.1 Western blot 细胞更换无血清培养液24 h后,用含10 μ mol/L LPA的无血清DMEM分别处理细胞0、0.5、2和4 h,收集细胞,加细胞裂解液提取总蛋白,取150 μ g总蛋白进行电泳,于10% SDS-PAGE进行蛋白分离后,电转移至硝酸纤维素膜,用含10%脱脂奶粉的TBST(0.05%)室温封闭1 h,分别加入兔抗人p-Smad2、Smad2多克隆抗体(1:1 000)4℃孵育过夜,二抗采用HRP标记的羊抗兔IgG(1:3 000),室温孵育1 h,用化学发光法显色。

1.4.2 细胞阻断实验 细胞准备及培养同1.3。实验时,对照组加入无血清的DMEM,其他组每孔细胞分别加入含不同浓度(10、20和50 μ g/mL)1D11(TGF- β 阻断抗体)的无血清DMEM并孵育2 h,或含100 nmol/L AG1478(EGFR阻断剂)的无血清DMEM孵育30 min,再加入10 μ mol/L的LPA刺激24 h,按1.3中的方法计算细胞数目。

1.4.3 细胞毒性实验 实验时,对照组加入无血清的DMEM,实验组加入含100 nmol/L AG1478的无血清DMEM并孵育24 h,按1.3中的方法计算细胞数目。

1.5 统计学分析

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0软件进行分析。组间数据的比较用单因素方差分析,组间方差不齐时,采用非参数检验。

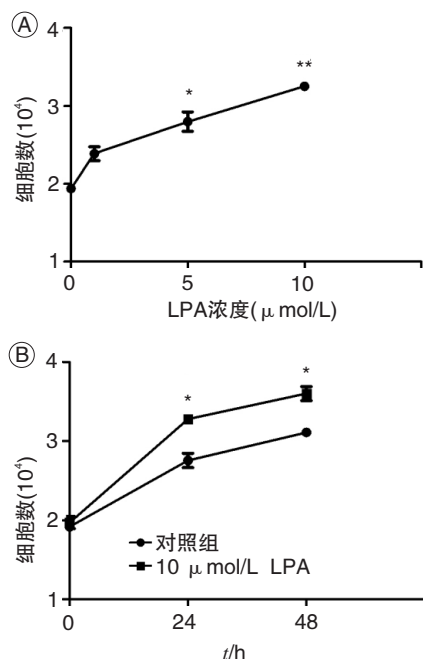
2 结果

2.1 LPA诱导SAS细胞增殖呈剂量和时间效应

细胞计数结果显示, SAS细胞在含有5 μ mol/L LPA培养液中培养24 h后细胞数与对照组比较差异已具有统计学意义($P < 0.05$),增加到10 μ mol/L时SAS细胞数是对照组的近1.7倍($P < 0.01$),见图1A。我们进一步检测了LPA对SAS细胞增殖是否呈时间效应关系,结果显示, SAS细胞增殖在对照组和10 μ mol/L LPA处理组均呈时间依赖性,但LPA处理组的增长率较高,在LPA刺激24 h后细胞数比对照组增加22%,两者间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。48 h后,对照组和LPA刺激



组细胞增殖速率均有所下降,但此时两组细胞数目差异仍具统计学意义($P<0.05$)。



A: 不同剂量LPA处理24 h对SAS细胞增殖的影响; B: 10 μmol/L LPA处理不同时间对SAS细胞增殖的影响. 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

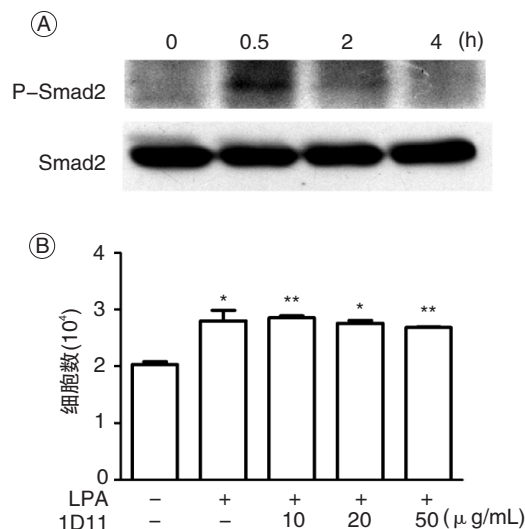
图 1 LPA对SAS细胞增殖的影响

2.2 TGF-β 活化不参与LPA诱导的SAS细胞增殖

我们用LPA刺激SAS细胞并采用Western blot检测TGF-β 下游信号分子Smad2是否可被磷酸化,结果显示,在10 μmol/L LPA刺激下,Smad2被磷酸化,且在0.5 h达到最高,说明LPA可诱导SAS细胞TGF-β 活化,见图2A。我们进一步利用TGF-β 阻断剂1D11来探讨TGF-β 是否参与LPA诱导的细胞增殖,结果显示, LPA可诱导SAS细胞增殖 ($P<0.01$),而不同浓度(10、20和50 μg/mL)的TGF-β 阻断抗体1D11均不能阻断这种增殖,提示LPA诱导SAS细胞的增殖并不是通过活化TGF-β 来完成的,见图2B。

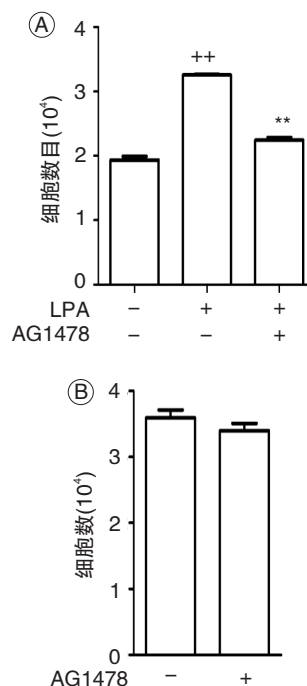
2.3 EGFR介导LPA诱导的SAS细胞增殖

我们用100 nmol/L的EGFR抑制剂AG1478预先孵育细胞30 min,再用10 μmol/L LPA刺激24 h,结果显示AG1478可明显抑制LPA诱导的SAS细胞增殖($P<0.01$),抑制率达到近77%,图3A。为进一步验证AG1478对LPA诱导的细胞增殖的抑制作用不是来源于药物毒性,我们进行了CCK-8细胞毒性实验,在细胞贴壁后,加入100 nmol/L的AG1478并孵育24 h,然后加入CCK-8孵育2 h,结果显示AG1478在孵育时间内对细胞并无毒性,见图3B,说明EGFR受体介导LPA诱导的SAS细胞增殖。



A: 10 μmol/L LPA处理不同时间对SAS细胞Smad2磷酸化的影响; B: TGF-β 阻断抗体1D11对10 μmol/L LPA诱导的SAS增殖的影响. 与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图 2 TGF-β 活化途径不参与LPA诱导的SAS细胞增殖



A: EGFR抑制剂AG1478 (100 nmol/L)对LPA (10 μmol/L)诱导SAS细胞增殖作用的影响; B: EGFR抑制剂AG1478 (100 nmol/L)对SAS细胞的毒性作用. 与对照组比较, ** $P<0.01$; 与LPA组比较, ** $P<0.01$.

图 3 AG1478抑制LPA诱导的SAS细胞增殖

3 讨论

LPA是一种具有多种生物学功能的水溶性甘油磷脂,它可刺激细胞增殖和迁移,参与诱导细胞骨架重排等^[1]。研究发现LPA可作为卵巢癌及其他妇科恶性肿瘤的标志物,并可通过p38 MAPK途径促进人肝癌细胞侵袭,转移和附着^[12]。LPA还可促进癌细胞的增殖,

Gschwind等^[4]发现在头颈鳞状细胞癌细胞中, LPA首先激活EGFR, 进而募集连接蛋白SHC和Gab1, 活化ERK/MAPK信号通路使细胞增殖^[4, 13-14]。而LPA是否可促进口腔鳞癌细胞增殖以及所涉及的通路尚未见报道。我们课题组前期研究发现在肺上皮细胞中LPA通过其受体LPA2及G蛋白G α_q 可诱导TGF- β 1活化^[5], 而TGF- β 活化可诱导成纤维细胞等细胞的增殖^[6-8, 10]。TGF- β 广泛参与哺乳动物的各种病理生理过程, 其通过胞膜上的受体和胞内Smads家族向核内传递信号, 调控靶基因, 影响细胞增殖, 而且TGF- β 也可通过其下游分子TAK1活化MAPK, 从而促进肿瘤细胞的增殖^[9]。因此, 我们探讨LPA是否可通过诱导TGF- β 活化从而诱导口腔鳞癌细胞增殖。

结果显示, LPA可诱导SAS增殖, 并呈明显的剂量效应关系, 其在5 μ mol/L浓度时细胞数与对照组比较差异已具有统计学意义($P<0.05$); 而在时间效应实验中, 虽然24 h后对照组及LPA刺激组的细胞均有所增加, 但LPA刺激组的增殖速率明显高于对照组($P<0.05$)。以上结果提示LPA有促进SAS细胞增殖的作用, 这一结果与Gschwind等^[4]报道的结果一致。由于有报道TGF- β 在促进肿瘤细胞增殖中起作用^[7-8, 10], 而且我们前期结果发现LPA可诱导TGF- β 活化, 于是我们进一步分析了TGF- β 是否参与LPA诱导的SAS细胞增殖。我们首先检测了LPA是否可在SAS细胞中活化TGF- β 。由于Smad2是TGF- β 信号通路中重要的信号分子, 而活化的TGF- β 可使Smad2磷酸化, 因此我们用LPA刺激SAS细胞并检测Smad2是否可被磷酸化。结果显示LPA可诱导TGF- β 下游重要的信号分子Smad2磷酸化, 因此认为LPA可在SAS细胞中活化TGF- β , 这一结果与我们前期在人支气管上皮细胞中的结果一致^[5]。我们又进一步利用TGF- β 阻断抗体1D11来探讨TGF- β 通路是否参与LPA诱导的细胞增殖, 而结果显示1D11不能阻断LPA诱导的SAS细胞增殖, 说明TGF- β 途径并不参与LPA诱导的SAS细胞增殖。

有文献报道, LPA可通过EGFR途径诱导多种细胞增殖, 如头颈部鳞状细胞癌^[4], 小鼠乳腺上皮细胞^[15], 人内皮细胞^[16]等。由于我们的结果提示TGF- β 不参与LPA诱导的SAS细胞增殖, 我们进一步探讨在SAS细胞中, LPA是否也通过EGFR途径诱导细胞增殖。我们利用经典的EGFR阻断剂AG1478来阻断LPA的效应, 结果显示AG1478可明显阻断LPA诱导的SAS细胞增殖, 说明LPA也是通过EGFR途径来诱导SAS细胞增殖的, 这一结果与文献^[4]报道的结果一致。

综上所述, 我们的结果证明EGFR转激活途径参

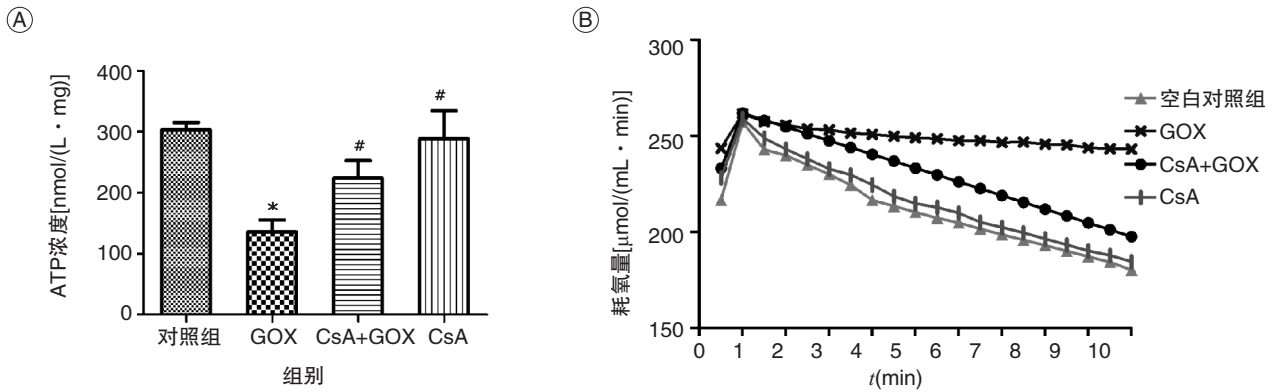
与了LPA诱导的口腔鳞癌细胞SAS的增殖, 而TGF- β 活化途径未参与LPA诱导的SAS细胞增殖, 本研究为进一步揭示LPA在口腔鳞癌发生发展中的作用以及为下游相关分子作为分子靶标奠定了基础。

参考文献

- [1] Chen SW, Wen YM, Li LJ, et al. Transfection of the nm23-H1 gene into BcaCD885 cell line inhibits the potential of invasion, adhesion and mobility[J]. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2003, 38 (1): 16-19.
- [2] Takayama S, Hatori M, Kurihara Y, et al. Inhibition of TGF-beta1 suppresses motility and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via modulation of integrins and down-regulation of matrix-metalloproteinases[J]. Oncol Rep, 2009, 21 (1): 205-210.
- [3] 邓小玲, 许铭炎, 傅玉才. LPA2 受体介导LPA 诱导的人支气管肺上皮细胞 PAI-1表达[J]. 热带医学杂志, 2010, 10 (20): 915-917.
- [4] Gschwind A, Prenzel N, Ullrich A. Lysophosphatidic acid-induced squamous cell carcinoma cell proliferation and motility involves epidermal growth factor receptor signal transactivation[J]. Cancer Res, 2002, 62 (21): 6329-6336.
- [5] Xu MY, Porte J, Knox AJ, et al. Lysophosphatidic acid induces alphavbeta6 integrin-mediated TGF-beta activation via the LPA2 receptor and the small G protein G alpha (q)[J]. Am J Pathol, 2009, 174 (4): 1264-1279.
- [6] Kaminska B, Kocyk M, Kijewska M. TGF-beta signaling and its role in glioma pathogenesis[J]. Adv Exp Med Biol, 2013, 986: 171-187.
- [7] Xiao L, Du Y, Shen Y, et al. TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway[J]. Front Biosci, 2012, 17: 2667-2674.
- [8] Jia L, Jin H, Zhou J, et al. A potential anti-tumor herbal medicine, Corilagin, inhibits ovarian cancer cell growth through blocking the TGF-beta signaling pathways[J]. BMC Complement Altern Med, 2013, 13 (1): 33.
- [9] Gogineni VR, Gupta R, Nalla AK, et al. uPAR and cathepsin B shRNA impedes TGF-beta1-driven proliferation and invasion of meningioma cells in a XIAP-dependent pathway[J]. Cell Death Dis, 2012, 3: 439.
- [10] Sun G, Cao D, Sun Z, et al. TGF-beta promotes colorectal cancer cell growth in vitro and in vivo[J]. Hepatogastroenterology, 2012, 60 (123): 751-759.
- [11] Nakanaga K, Hama K, Aoki J. Autotaxin-an LPA producing enzyme with diverse functions[J]. J Biochem, 2010, 148 (1): 13-24.
- [12] Zhu B, Shi S, Ma YG, et al. Lysophosphatidic acid enhances

(下转第15页)





A: 对ATP水平的影响; B: 对线粒体耗氧水平的影响. 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与25 U/L GOX组比较, # $P < 0.05$.

图5 CsA预处理和GOX对HepG2细胞粒体能量供应水平的影响($n=3$)

有良好的研发前景。

临床上使用CsA治疗器官移植的免疫排斥反应和缺血再灌注损伤时,剂量是关键,剂量过高会导致一定的肝肾毒性,我们的实验结果也证实过高剂量对细胞本身会造成损伤。因此,合理使用CsA可以一定程度保护氧化应激造成的肝损伤。

参考文献

- [1] Talukder MA, Zweier JL, Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 84(3): 345-352.
- [2] Nobili V, Pastore A, Gaeta LM, et al. Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 355(1): 105-111.
- [3] Madsen KG, Olsen J, Skonberg C, et al. Development and evaluation of an electrochemical method for studying reactive phase-I metabolites: correlation to in vitro drug metabolism[J]. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20(5): 821-831.
- [4] Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity[J]. *Cell Calcium*, 2010, 47(2): 122-129.
- [5] Rasheva VI, Domingos PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2009, 14(8): 996-1007.
- [6] 吴伟, 徐蔚. 线粒体通透性转换孔结构和功能的研究进展[J]. *医学信息: 下旬刊*, 2011, 24(3): 1753-1754.
- [7] Takeyama N, Miki S, Hirakawa A, et al. Role of mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide induced apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 274(1): 16-24.
- [8] Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition[J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(4): 1127-1155.
- [9] Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress[J]. *Biomed Pharmacother*, 2004, 58(1): 39-46.
- [10] Kinnally KW, Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels MAC and PTP in apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 857-868.
- [11] Perl A, Nagy G, Gergely P, et al. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Methods Mol Med*, 2004, 102(1): 87-114.
- [12] human hepatocellular carcinoma cell migration, invasion and adhesion through P38 MAPK pathway[J]. *Hepato-gastroenterology*, 2011, 59(115/116): 785-789.
- [13] Daub H, Weiss FU, Wallasch C, et al. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors[J]. *Nature*, 1996, 379(6565): 557-560.
- [14] Prenzel N, Zwick E, Daub H, et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF[J]. *Nature*, 1999, 402(6764): 884-888.
- [15] Yuh IS. Lysophosphatidic acid (LPA) stimulates mouse mammary epithelial cell growth[J]. *Cell Biol Int*, 2011, 35(9): 875-881.
- [16] Wu HL, Lin CI, Huang YL, et al. Lysophosphatidic acid stimulates thrombomodulin lectin-like domain shedding in human endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(1): 162-168.

(上接第9页)

